

(19) Federal Republic of Germany

German Patent Office

(12) Laid-Open Application Publication

(10) DE19831424A1

5 (51) International Classification:

G01N21/47

G01N21/55

G01N21/17

G01J3/42

10 (21) Application Number: 19831424. 8

(22) Filing Date: July 14, 1998

(43) Publication Date: February 3, 2000

(71) Applicant:

MBR, Inc. 58313, Herdecke, DE

15 (74) Attorney:

Boehmert & Boehmert, 24105 Kiel

(72) Inventor:

Dr. Holger Jungman, 45896 Gelsenkirchen, DE;

Dr. Michael Shietzel, 58313, Herdecke, DE

20 (56) Reference

US 5588427

EP 0810429A1

The following data is extracted from the source material  
submitted by the applicant:

25 Request for examination according to Section 44 of  
the Patent Act

( 5 4 ) SPECTROSCOPIC METHOD FOR DETERMINING CONCENTRATION  
OF SUBSTANCE DISTRIBUTED IN SCATTERING MEDIUM

( 5 7 ) A spectroscopic method for determining a  
concentration of substance distributed in a scattering  
medium, comprising:

- a step of directionally irradiating light with  
continuous spectrum on said substance;

- a step of receiving light that is re-radiated in  
a predetermined direction by said substance;

- a step of correlating the re-radiated light with  
a certain standard to detect the re-radiation as a function  
of wavelength;

- a step of inserting a defined non-absorbable  
scattering medium into the pathway of light;

- a step of receiving light that is re-radiated in  
a predetermined direction by the sample and said scattering  
medium;

- a step of correlating re-radiated light with said  
standard to detect the re-radiation caused by the sample  
and said scattering medium;

- a step of imaging a detected re-radiation in a case  
when there is no said scattering medium with the re-radiation  
by said scattering medium;

- a step of determining the fractal size of said  
imaging; and

- a step of detecting said concentration of substance

based on the fractal size.



19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

12 **Offenlegungsschrift**  
10 **DE 198 31 424 A 1**

51 Int. Cl. 7:  
**G 01 N 21/47**  
G 01 N 21/55  
G 01 N 21/17  
G 01 J 3/42

21 Aktenzeichen: 198 31 424.8  
22 Anmeldetag: 14. 7. 1998  
43 Offenlegungstag: 3. 2. 2000

DE 198 31 424 A 1

71 Anmelder:  
MBR GmbH, 58313 Herdecke, DE  
  
74 Vertreter:  
BOEHMERT & BOEHMERT, 24105 Kiel

72 Erfinder:  
Jungmann, Holger, Dr., 45896 Gelsenkirchen, DE;  
Schietzel, Michael, Dr., 58313 Herdecke, DE  
  
55 Entgegenhaltungen:  
US 55 88 427  
EP 08 10 429 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- 54 Spektroskopisches Verfahren zur Bestimmung der Konzentration eines in einem streuenden Medium verteilten Stoffes
- 57 Spektroskopisches Verfahren zur Bestimmung der Konzentration eines in einem streuenden Medium verteilten Stoffes, mit den folgenden Schritten:
- gerichtetes Bestrahlen des Mediums mit Licht mit einem kontinuierlichen Spektrum,
  - Aufnehmen des in einer bestimmten Richtung von dem Medium remittierten Lichts,
  - Ermitteln der Remission des remittierten Lichts als Funktion der Wellenlänge unter Inbezugsetzen zu einem Standard,
  - Einbringen eines absorptionsfreien definierten Streumediums in den Lichtweg,
  - Aufnehmen des in der bestimmten Richtung von der Probe und dem Streumedium remittierten Lichts,
  - Ermitteln der Remission der von der Probe und dem Streumedium remittierten Lichts unter Inbezugsetzen zu dem Standard,
  - Abbilden der ohne Streumedium ermittelten Remission auf die mit dem Streumedium ermittelten Remission,
  - Bestimmen der fraktalen Dimension der Abbildung, und
  - Ermitteln der Konzentration der Substanz aus der fraktalen Dimension.

DE 198 31 424 A 1

## Beschreibung

Die spektroskopische Bestimmung der Konzentration eines Stoffes in einem Medium kann mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes durchgeführt werden:

$$E(\lambda) = \log(I_0(\lambda)/I(\lambda)) = \epsilon(\lambda) \cdot c \cdot d \quad (1).$$

Dabei bedeutet:

$I_0(\lambda)$  die Intensität des eingestrahnten Lichtes bei der Wellenlänge  $\lambda$  und  $I$  die Intensität des durchgelassenen Lichtes bei der Wellenlänge  $\lambda$ ,

$\epsilon(\lambda)$  der molare wellenlängenabhängige Extinktionskoeffizient,

$E(\lambda)$  die Extinktion in Abhängigkeit der Wellenlänge  $\lambda$ ,

$c$  die molare Konzentration der zu untersuchenden Substanz, und

$d$  die optische Weglänge (z. B. Dicke der Meßküvette).

Eine wesentliche Voraussetzung für die Anwendbarkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes ist, dass das parallele Meßlicht innerhalb der Probe ebenfalls parallel ist. Diese Forderung ist gleichbedeutend damit, dass die Streuung der Probe null bzw. klein ist.

Sind die obigen Voraussetzungen erfüllt und ist die optische Weglänge  $d$  bekannt, so kann die Konzentration einer Substanz bestimmt werden, deren Extinktionskoeffizient bekannt ist. Dazu wird die Extinktion der Probe gemessen. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz kann anschließend die Konzentration berechnet werden.

In fast allen Fällen der in-vivo Spektroskopie ist jedoch die optische Weglänge  $d$  nicht bekannt. Aus diesen Gründen kann das Lambert-Beersche Gesetz nicht angewendet werden. Der Grund für die Unkenntnis des optischen Weges  $d$  liegt im wesentlichen in der unterschiedlichen Streueigenschaft des zu untersuchenden Gewebes. Durch die Streuung legt der Lichtstrahl eine längere Strecke im Medium gegenüber der kürzesten Verbindung Lichteintritt – Lichtaustritt zurück.

Ebenso ist bei allen Reflexionsmessungen die optische Weglänge unbekannt. Auch bei diesen Messungen legt der reflektierte Lichtstrahl einen unbekannten und im allgemeinen unbestimmbaren Lichtweg im Medium zurück. Besteht das durchleuchtete Medium zusätzlich aus optisch und quantitativ unterschiedlichen Substanzen, wie dies bei lebenden Geweben der Fall ist, so ist es aussichtslos die Größe des optischen Lichtweg aus theoretischen Modellen oder aus Erfahrungswerten für eine spezielle Meßsituation zu bestimmen. Es werde also in weiteren der Fall betrachtet, wie er in der Gewebespektroskopie vorliegt, dass die untersuchten Substanzen wenig oder keine Streuung besitzen, so dass das Lösungsmittel bzw. die Stoffe, in der die zu untersuchenden Substanzen eingebettet sind, den hauptsächlichsten Anteil zur Streuung beiträgt.

Die Bestimmung der optischen Weglänge, die im allgemeinen nicht mit der kürzesten Strecke zwischen dem Lichteintritt und dem Lichtaustritt identisch ist, ist also eine notwendige Voraussetzung für eine Konzentrationsbestimmung auch in stark streuenden Medien.

Die Konzentrationsbestimmung nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ist zwar die einfachste und verbreitetste spektroskopische Analysenmethode, zu ihrer Abwendungen müssen aber die oben beschriebenen Voraussetzungen erfüllt sein. Diese Methode ist daher nur unter Laborbedingungen durchführbar. In den Fällen, in denen die optische Weglänge unbekannt ist, kann die Konzentration des Stoffes nur bis auf eine multiplikative Konstante, also lediglich relativ bestimmt werden. Damit ist eine Absolutkalibrierung der Änderungen der Stoffkonzentration, nicht jedoch der

Stoffkonzentration selbst möglich.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung der absoluten Konzentration eines Stoff in einem streuenden Medium zu schaffen, zu schaffen, dass keine vorherige Kenntnis der optischen und quantitativen Eigenschaften des streuenden Mediums verlangt.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe gelöst durch gerichtetes Bestrahlen des Mediums mit Licht mit einem kontinuierlichen Spektrum, Aufnehmen des in einer bestimmten Richtung von dem Medium remittierten Lichts, Ermitteln der Remission des remittierten Lichts als Funktion der Wellenlänge unter Inbezugsetzen zu einem Standard, Einbringen eines absorptionsfreien definierten Streumediums in den Lichtweg, Aufnehmen des in der bestimmten Richtung von der Probe und dem Streumedium remittierten Lichts, Ermitteln der Remission der von der Probe und dem Streumedium remittierten Lichts unter Inbezugsetzen zu dem Standard, Abbilden der ohne Streumedium ermittelten Remission auf die mit dem Streumedium ermittelten Remission, Bestimmen der fraktalen Dimension der Abbildung, und Ermitteln der Konzentration der Substanz aus der bestimmten fraktalen Dimension.

Voraussetzung für eine quantitative Spektroskopie ist die Kenntnis der Streuung der Substanzen und damit der optischen Weglängen. In der Abb. 1 ist das Reflexionsspektrum von oxigeniertem Hämoglobin in der oberen Kurve mit und in der unteren Kurve ohne zusätzlichem Streumedium aufgenommen. In beiden Fällen handelt es sich um die gleiche Menge an gelöstem Hämoglobin. Es wird sofort deutlich, dass die Abwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes im Falle der Hämoglobinnmessung mit einem streuenden Medium zu völlig falschen Konzentrationen führen würde.

In der Abb. 2 ist die Funktion  $f$ : Extinktion (Hb mit Streumittel)  $\rightarrow$  Extinktion (Hb ohne Streumittel) aufgetragen. Es wird deutlich, dass es sich bei der Funktion  $f$  um eine nicht-lineare Funktion handelt. Aus physikalischen Gründen ist  $f$  eineindeutig. Die Streuung hängt im wesentlichen von der Größe und der Streupartikel im Verhältnis zur Wellenlänge des Lichtes und der Anzahl der streuenden Partikel ab. Denn für  $\langle I_s(K) \rangle$ , die mittlere gestreute Lichtintensität als Funktion des Wellenvektors  $K$ , gilt:

$$I_s(K) = A I_0 c S(K).$$

Dabei gilt:  $I_0$  ist die einfallende Lichtintensität,  $c$  die Partikelkonzentration,  $S(K)$  beschreibt die mittlere Interferenz zwischen den Teilchen,  $A$  ist eine Konstante.  $S(K)$  beschreibt im wesentlichen die Wahrscheinlichkeitsdichte, mit der ein Teilchen in der Entfernung  $r$  von einem anderen Teilchen gefunden werden kann.

Damit gilt:  $\langle I_s(K) \rangle = I_0 - (I_{\text{Absorp}} + I_M)$ , wobei  $I_{\text{Absorp}}$  die Lichtmenge die absorbiert worden ist und  $I_M$  die Lichtmenge, die durch Streuung nicht auf den Detektor fällt, angibt.  $I_M$  kann jedoch durch geeignete Wahl des Detektors klein gemacht werden.

Somit kann die Streuung durch die Funktion  $f$  ermittelt und damit das Spektrum bei bekannter Konzentration korrigiert werden. Jedoch gilt dies nur für homogen verteilte Substanzen und Einkomponentengemische. In der Abb. 3 sind zwei Funktionen mit gleichem Streuanteil aber mit unterschiedlicher Konzentration dargestellt. Da die Streuung konstant ist, existiert eine lineare Funktion  $g$ , die die Funktion  $f$  in Abhängigkeit von der Konzentration aber bei konstanter Streuung in die Funktion  $f$  überführt. In der Abb. 4 stellt dieser Sachverhalt noch einmal dargestellt. Die Gerade stellt die Abb.  $g$ :  $E(4 \text{ mg Hb} + \text{Streul}) \rightarrow E(2 \text{ mg Hb} + \text{Streul})$  dar. Die Kurve stellt die Abb.  $f$ :  $E(4 \text{ mg Hb} + \text{Streul})$

→ E (4 mg Hb + 2 · Streu1) dar, die eine nicht-lineare Funktion ist. Somit ergibt sich, dass die Streuung durch eine nicht-lineare Funktion gemessen werden kann.

Mit Hilfe der nicht linearen Funktion  $f$  kann somit jedes Spektrum hinsichtlich der Streuung korrigiert werden. Jedoch gilt dies nur für homogen verteilte Substanzen und Einkomponentengemische.

Aus der Abb. 4 kann der Rechenalgorithmus entnommen werden: Der Winkel der linearen Funktion  $g$  zur x-Achse bestimmt die Konzentrationsdifferenz der bekannten Urbildfunktion zum gemessenen Spektrum. Beträgt der Winkel  $45^\circ$  sind beide Konzentrationen gleich groß. Ist die Funktion  $f$  noch nicht-linear, muß die Urbildfunktion solange approximiert werden, bis die Funktion  $f$  in die lineare Funktion  $g$  übergeht. Dann ist die Streuung korrigiert und die Konzentration bekannt.

Jedoch gibt es in der In-vivo-Spektroskopie Nicht-Linearitäten, die dem Spektrum additiv überlagert sind. Dazu zählen die Nicht-Linearitäten, die durch die inhomogene Verteilung der Substanzen erzeugt werden. In der Abb. 5 ist eine solche Nicht-Linearität durch inhomogene Farbstoffverteilung dargestellt. Hierbei handelt es sich um ähnliche Nicht-Linearitäten wie diejenigen, die durch Streuung verursacht worden sind.

Um die Nicht-Linearitäten zu trennen, die von unterschiedlichen physikalischen Gegebenheiten erzeugt worden sind, wird eine Streuscheibe bekannter Streuung benötigt. Wird nun das Gewebe einmal mit und einmal ohne Streuscheibe gemessen, addieren sich bei der Messung mit der Streuscheibe alleine die Nicht-Linearitäten, die durch Streuung hervorgerufen worden sind.

In der Abb. 6 ist eine Nicht-Linearität dargestellt, die durch eine Hautmessung bestimmt worden ist. Wie man sieht, handelt es sich hierbei um stückweise nicht-lineare Abbildungen. Die Darstellung insgesamt stellt aber keine Funktion dar. Um die Nicht-Linearitäten bestimmen zu können, wird auf die Nicht-Lineare-Dynamik zurückgegriffen. Die Nicht-Linearitäten aus der Abb. 6 können wie folgt bestimmt werden: Zunächst bestimmt man eine Überdeckung der Nicht-Linearität mit Teilmengen des  $\mathbb{R}^n$ , in diesem Fall mit Kugeln des Durchmesser  $\delta$ . Es wird die Zahl  $N$  der Objekte bestimmt, die zur Überdeckung notwendig sind. Dieses Verfahren wird auf kleiner werdende  $\delta$  angewendet. Eine Approximation der fraktalen Dimension der Nicht-Linearität ist die Steigung der Geraden für die unterschiedlichen Werte  $\log(N)$  und  $\log(\delta)$ . Diese fraktale Dimension  $D$  beschreibt nun eindeutig die Nicht-Linearität. Aus der zweiten Messung mit der Streuscheibe, kann nun die Änderung der fraktalen Dimension  $D$  durch die bekannte Streuung  $S'$  der Streuscheibe ermittelt werden. Diese Änderung hängt aber wie oben dargestellt, alleine von der vorhandenen Nicht-Linearität des Streuverhaltens der Probe ab. Damit ist die Streuung der Probe bestimmt.

#### Patentansprüche

1. Spektroskopisches Verfahren zur Bestimmung der Konzentration eines in einem streuenden Medium verteilten Stoffs, **gekennzeichnet durch:**

- gerichtetes Bestrahlen des Mediums mit Licht mit einem kontinuierlichen Spektrum,
- Aufnehmen des in einer bestimmten Richtung von dem Medium remittierten Lichts,
- Ermitteln der Remission des remittierten Lichts als Funktion der Wellenlänge unter Inbezugsetzen zu einem Standard
- Einbringen eines absorptionsfreien definierten

Streuemediums in den Lichtweg,

Aufnehmen des in der bestimmten Richtung von der Probe und dem Streumedium remittierten Lichts,

- Ermitteln der Remission der von der Probe und dem Streumedium remittierten Lichts unter Inbezugsetzen zu dem Standard,
- Abbilden der ohne Streumedium ermittelten Remission auf die mit dem Streumedium ermittelten Remission,
- Bestimmen der fraktalen Dimension der Abbildung, und
- Ermitteln der Konzentration der Substanz aus der bestimmten fraktalen Dimension.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Abbilden der ohne das Streumedium ermittelten Remission auf die mit dem Streumedium ermittelten Remission nach der Theorie von Kubelka/Munk erfolgt.

Hierzu 6 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

Oxygeniertes Hämoglobin mit unterschiedlich streuenden Zusatzstoffen

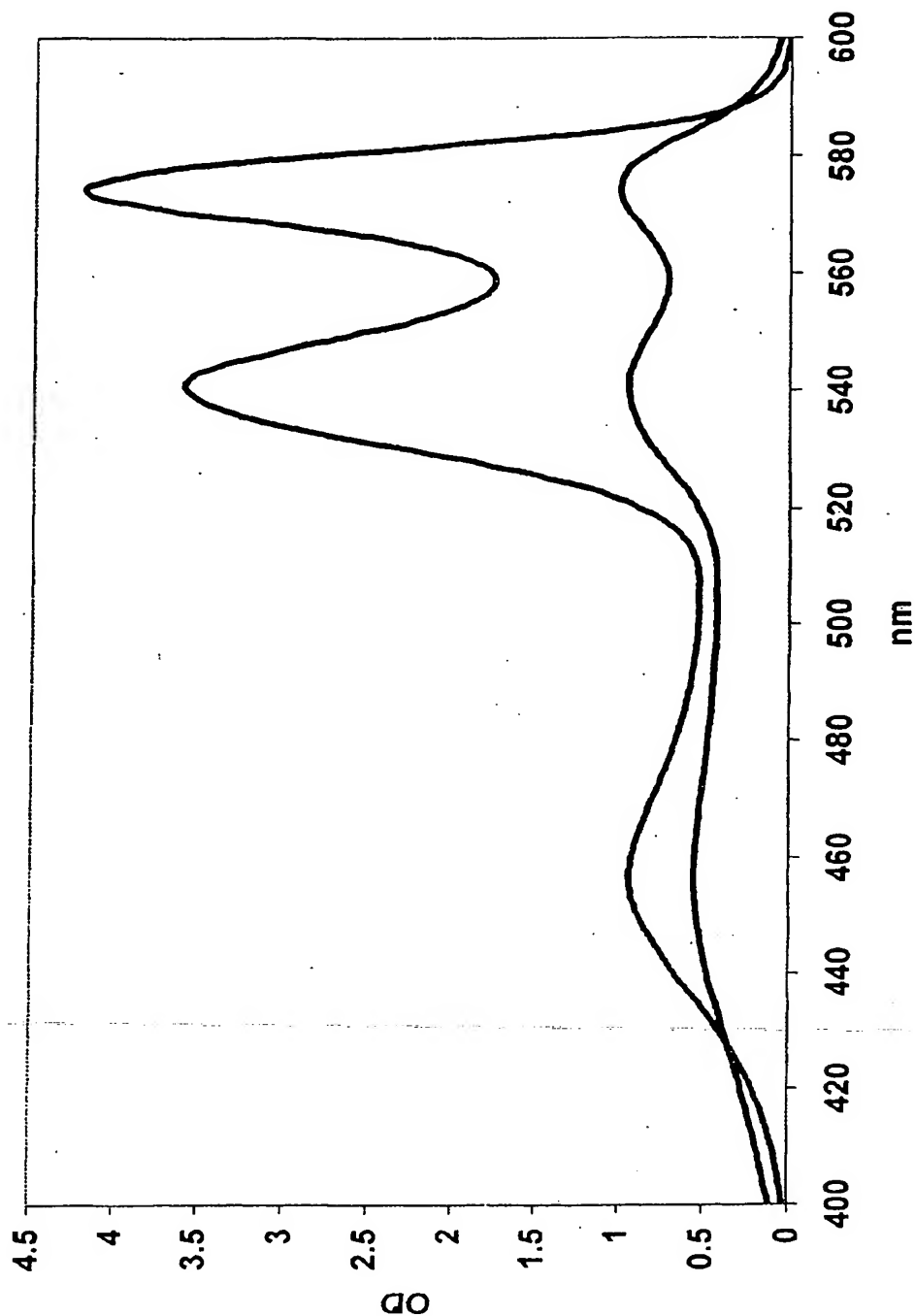


Abbildung 1



Funktion:  $E(\text{Hb+Streu}) \rightarrow E(\text{Hb})$

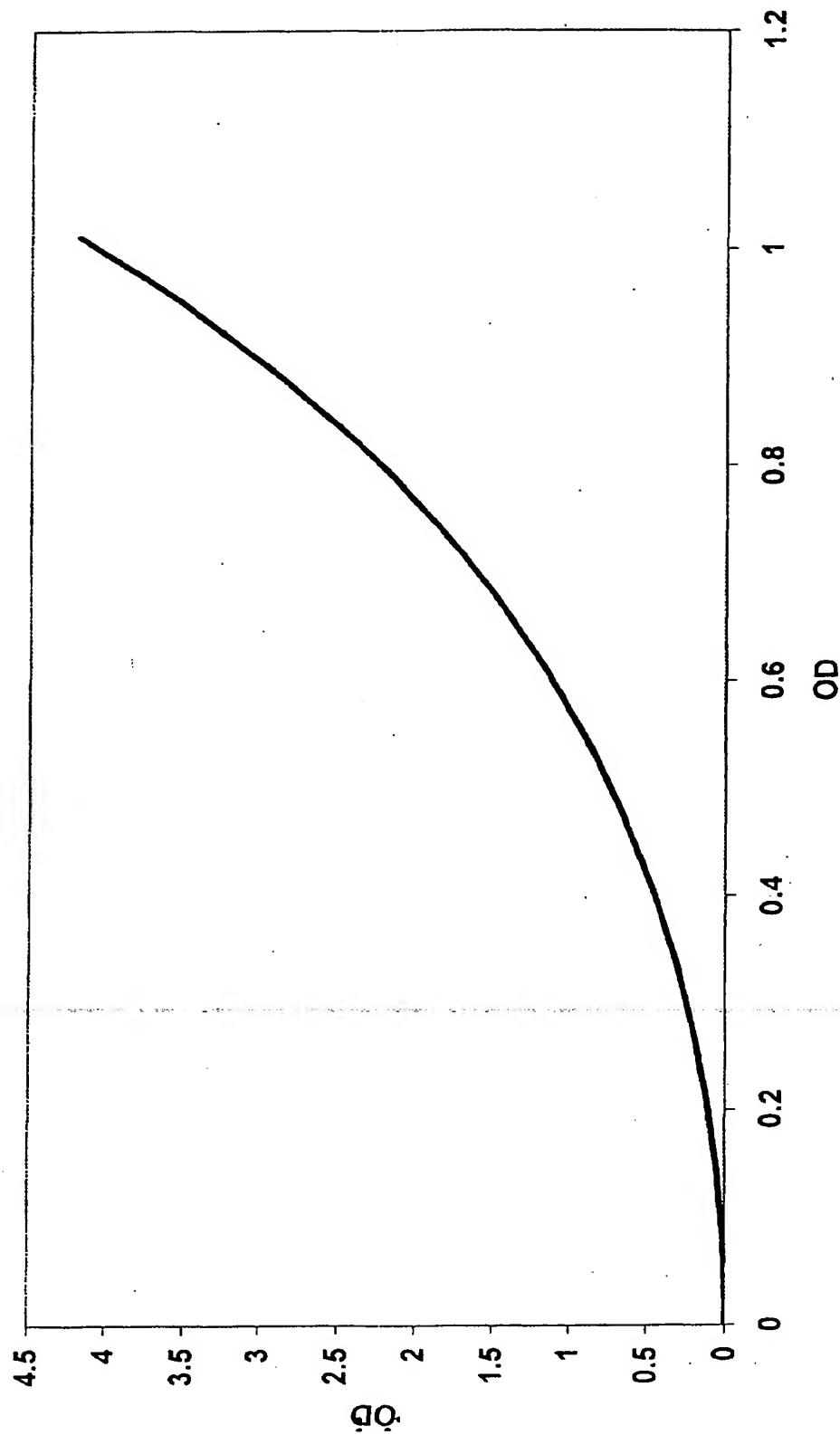


Abbildung 2

Funktion:  $E(\text{Hb} + \text{Streu}) \rightarrow E(\text{Hb})$

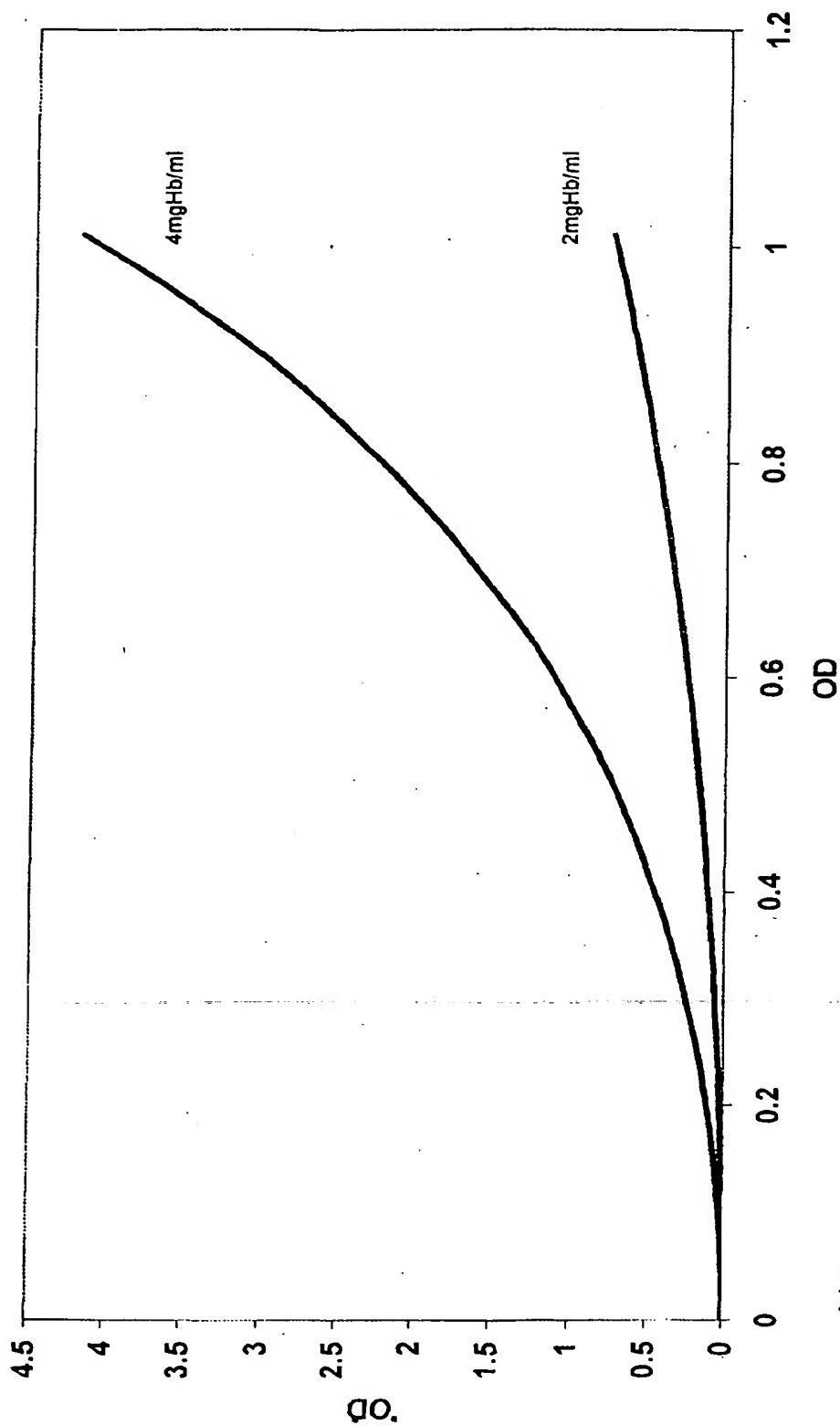


Abbildung 3

# Funktionen zweier unterschiedlicher Streuungen

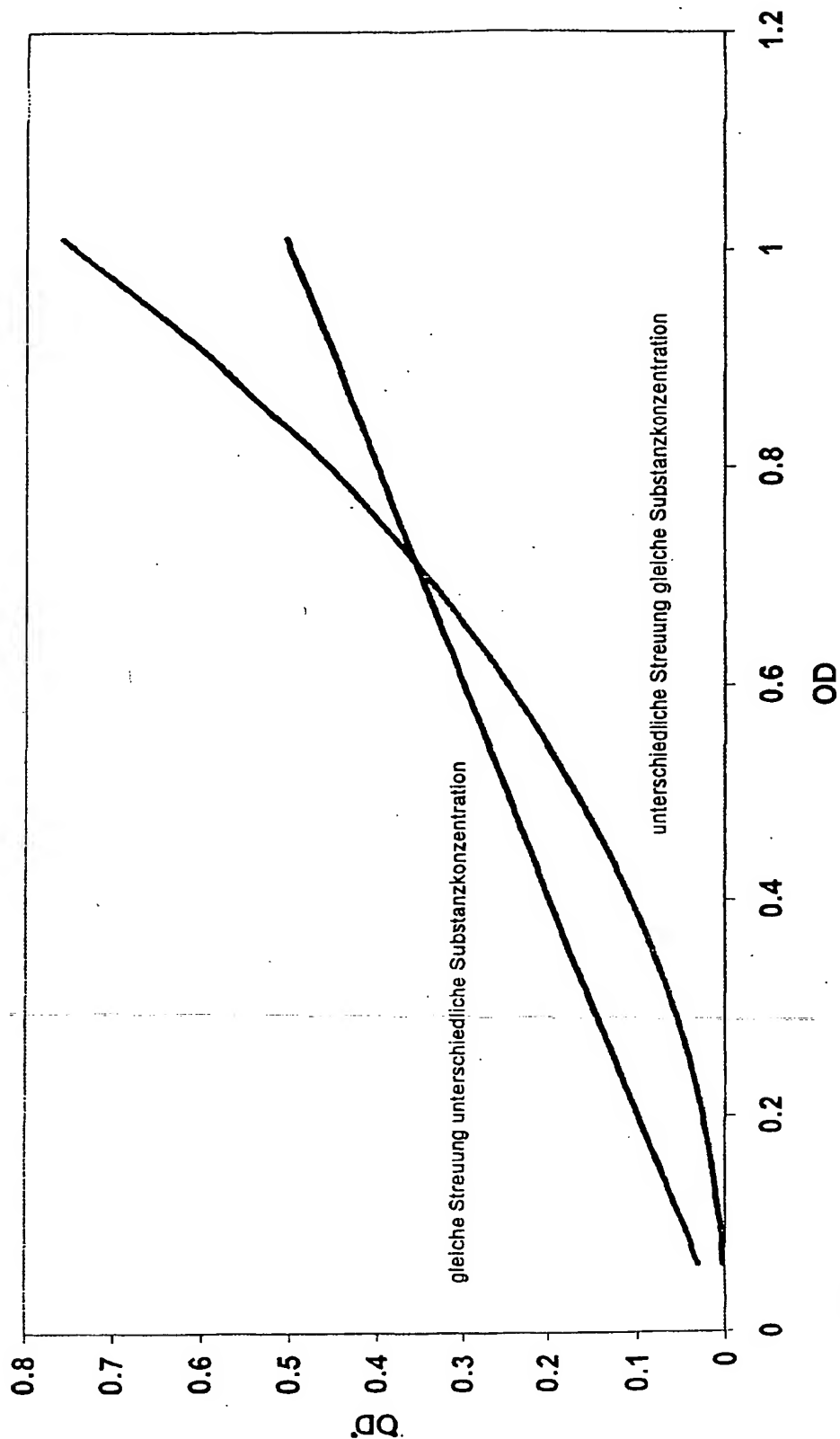


Abbildung 4

Inhomogene Hb-Verteilung(60%Hb,40% konstant)

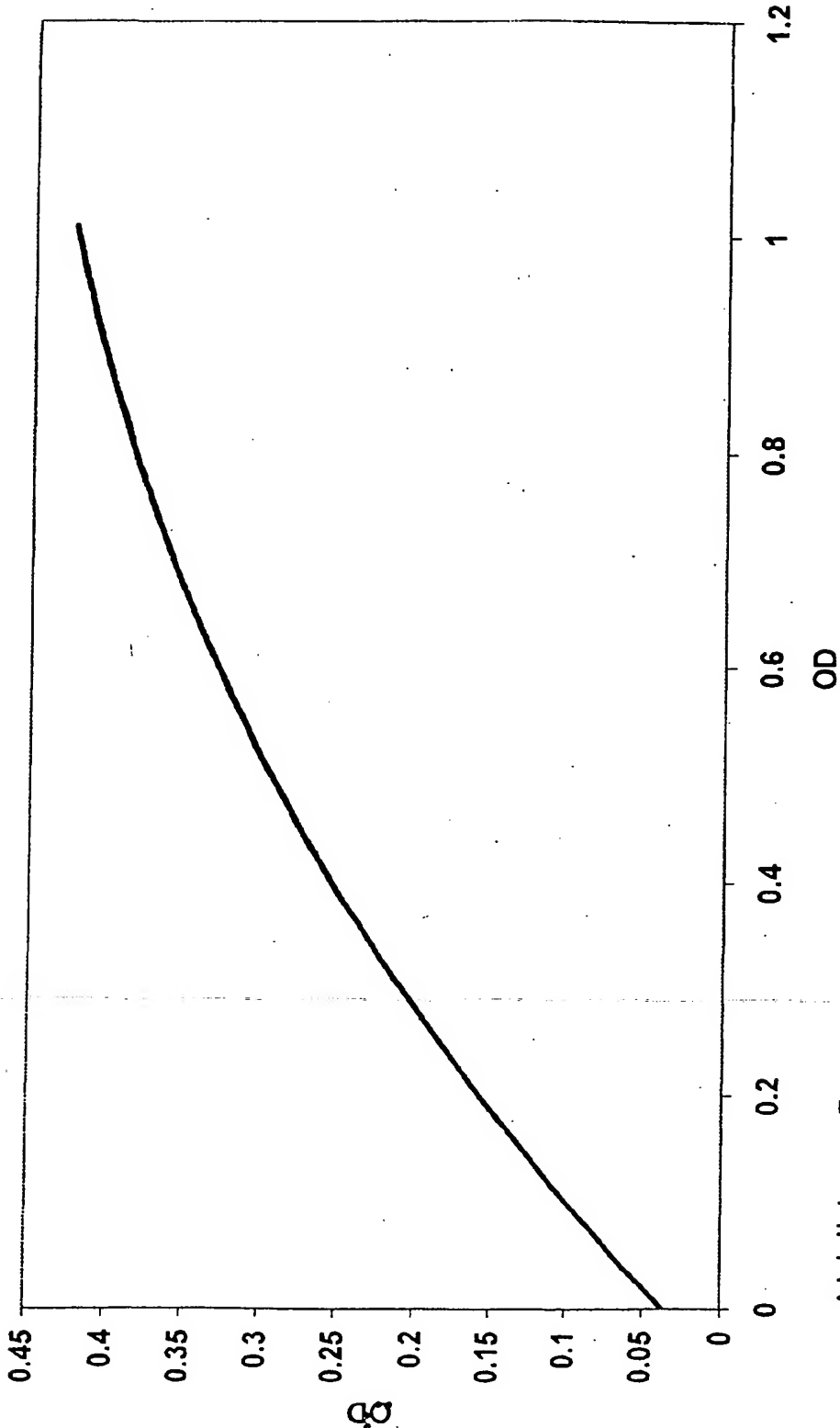


Abbildung 5

f: (Ext:Substanz a) ->(Ext: Substanz c)

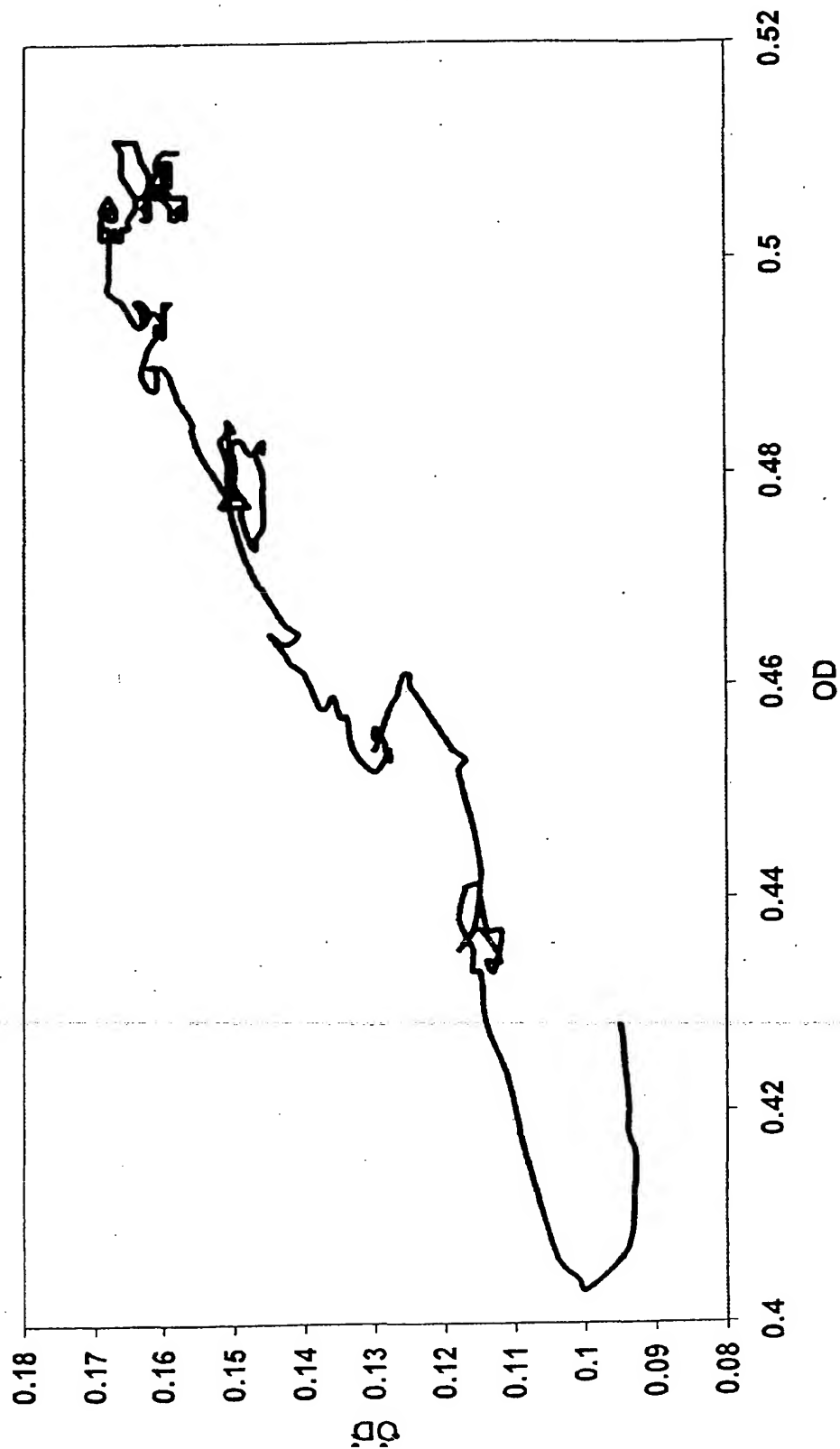


Abbildung 6